

Új, laparoszkópos beültetésre alkalmas sérvháló állatkísérletes vizsgálata

Guba Péter Marcell

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kísérletes és Sebészeti Műtéttani Intézet, Budapest

Bevezetés: A hálóval történő hasfal-rekonstrukció a sebészetben széles körben alkalmazott eljárás. A nem felszívódó hálók azonban számos komplikációt okozhatnak. **Célkitűzés:** Felszívódó, polimeralapú háló készítése, amely megfelelő kémiai, mechanikai és biológiai tulajdonságokkal rendelkezik. **Módszer:** A szerző háromdimenziós biokompatibilis, polivinil-alkoholból, reaktív electrospinninggel készült hálót használt. A toxicitási és sejt–háló kölcsönhatási vizsgálatok humán tüdőcarcinoma epithelialis sejteken (A-549), az *in vivo* vizsgálatok pedig 42 hím Wistar patkányon történtek a posztoperatív 1–5., 7. és 14. napon (3 patkány/csoport). **Eredmények:** Az *in vitro* kísérletekben a polivinil-alkohol biokompatibilisnek bizonyult, az *in vivo* kísérletekben a belőle készült háló vizsgálata során a hálóval összefüggésbe hozható major komplikáció nem fordult elő. **Következtetések:** Megállapítható, hogy ez a polimerháló szövetbarát, a környező szöveteket nem károsítja, azokkal jól integrálódik. Orv. Hetil., 2016, 157(5), 180–184.

Kulcsszavak: hasfali sérv, sebészeti háló, polivinil-alkohol

A novel surgical mesh suitable for laparoscopy studied on animal model

Introduction: Reconstruction of the abdominal wall with mesh is a widely used surgical procedure. The non-absorbable meshes tend to cause numerous side-effects. **Aim:** The aim of the author was to produce an absorbable, polymer-based mesh that possesses appropriate chemical, mechanical and biological properties. **Method:** A three-dimensional, biocompatible mesh was produced from poly-vinyl-alcohol using reactive electrospinning. Toxicity and cell-mesh interactions were tested using human lung carcinoma epithelial cells (A-549), and *in vivo* tests were conducted in 42 male Wistar rats at the 1–5, 7 and 14 postoperative days (3 rats/groups). **Results:** In the *in vitro* tests poly-vinyl-alcohol was biocompatible. In the *in vivo* tests no major complication was associated with the mesh made of poly-vinyl-alcohol. **Conclusions:** The author concludes that this polymer mesh is biocompatible, it does not damage the surrounding tissues and integrates well with them.

Keywords: abdominal hernia, surgical mesh, poly-vinyl-alcohol

Guba, P. M. [A novel surgical mesh suitable for laparoscopy studied on animal model]. Orv. Hetil., 2016, 157(5), 180–184.

(Beérkezett: 2015. november 9.; elfogadva: 2015. december 3.)

Rövidítések

GDA = glutáraldehid; PVA = polivinil-alkohol

A sérv a hasfal bármely részének gyengesége vagy folytonosságának megszakadása, a hasfali bemetszéssel járó műtétek után 10%-ban alakul ki. Az ilyen esetek egyik

megoldása a sebészi hálók alkalmazása lehet, ilyenkor a hagyományos sebellátással szemben jelentősen csökken a posztoperatív morbiditás, a recidívaarány és a gyógyulási idő [1, 2].

A nem lebomló polipropilén hálót több mint 50 éve használják [3]. A praeperitonealis elhelyezéssel szemben ezek intraperitonealis alkalmazása sok komplikációval jár,

például fistulák és infekciók, adhéziók kialakulása, a háló kimozdulása és krónikus fájdalom [4]. A hasüregi adhézió olyan patológiás összenövés, ami jellemzően a cseplesz, a vékony- és vastagbelek, a hasfal és más hasüregi szervek között található meg [5, 6].

Néhány részlegesen és teljesen felszívódó hálótípus elérhető. A kisebb mennyiségű idegen test és a kevesebb idő, amelyet a hasüregben tölt, kevesebb szövődémmel jár [7]. A felszívódó hálók beültetése jó eredményeket mutat [8]. A pozitív tapasztalatok és a szövődmények ismeretében megfogalmaztuk az elvárásainkat: az ideális sebészeti háló biológiailag lebomló, rugalmas, nem okoz adhéziót, biokompatibilis és lebomlása során nem képez toxikus metabolitokat. Erre a feladatra a polimerekből készült nanoszálak ígéretesnek tűnnek.

A polimeralapú hálók pórusos szerkezetűek, így képesek arra, hogy utánozzák az extracelluláris mátrixot. Kutatásunk célja, hogy megtaláljuk az ideális hálót, amelynek felszívódása szövődégmentes, és megjósolható ideig tart. A vizsgálatokat saját fejlesztésű, nanotechnológiával készített polivinil-alkohol (PVA) hálókvalifikációval végeztük.

Módszer

A PVA hidrofíli, nem toxikus és biológiailag lebomló polimer. A nanoszálak elkészítésére számos módszer létezik, például az általunk alkalmazott electrospinning (1. ábra).

Az electrospinning folyamata

Elektromos teret hoztunk létre egy polimeroldat és egy gyűjtőfelület között. Egy fecskendőben található az oldat, amit ennek nyílásánál a felületi feszültség egy csepp formájában tart. Felszínét az elektromos mező feltölti. Ahogy az elektromos tér intenzitása növekszik, a fecskendő végén a csepp megnyúlik és kialakul a Taylor-tölcsér. Amikor a töltött részecskék taszító ereje meghaladja a felületi feszültséget, egy oldatnyaláb hagyja el a tölcser tetejét, ennek átmérője a levegőben csökken. Emiatt a felületi töltéssűrűség megnő, és a kezdeti szál számos apróbb szárra oszlik, amelyek összegyűlnek a gyűjtőfelületen, egy véletlenszerű elrendeződésű, nanométeres vastagságú szálakból álló hálózatot alkotva [9]. Az 1. ábra mutatja a berendezés sematikus elrendezését.

A nanoszálak készítése PVA-ból olcsó módszer [10]. A PVA-t vízben oldottuk 90 °C-on két óra alatt, és további 30 percig pihentettük, hogy biztosítsuk a homogenizációt. Koncentrációja 5–15 tömegszázalék volt. A PVA egy földelt gyűjtőfelület felett volt felfüggesztve egy kapillárisban. A feszültség rákapcsolásával szálakra szakadt, ezek a gyűjtőfelülethez vonzódtak. Az elektromos erő több ezerszeres mértékben nyújtja meg a szálakat, amelyek így a textilszálaknál egy-két nagyságrenddel vékonyabbak lesznek [11], emiatt a felület-tömeg arány nagy lesz. Végül az oldószer elpárolog, és a szálak meg-

szilárdulnak. Az eredményül kapott nanoszálak szabálytalan szerkezetű szövetet alkotnak (2. ábra, bal oldal), ez kompakt, körülbelül 1 mm vastagságú (2. ábra, jobb oldal). A hálót beültetés előtt ClO₂-oldattal sterilizáltuk [12].

In vitro vizsgálatok

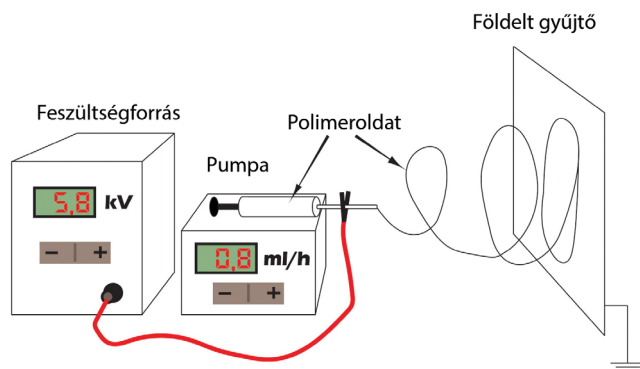
In vitro tanulmányainkban a PVA-háló lebomlásakor keletkező molekulák toxicitását, illetve a háló-sejt interakciót vizsgáltuk humán tüdőcarcinoma epithelialis sejteken (A-549). Először különböző koncentrációjú (10⁻⁸–0,8 g/100 g) PVA-oldatok biokompatibilitását mértük. Az oldatot médiumban áztatott PVA-hálóból és glutaraldehidből készítettük (GDA), majd összekevertük a médiummal, mielőtt sejteket helyeztünk bele. A GDA crosslinker szerepet tölt be, a polimer vízben való oldásának elkerülésére.

A következő kísérletben a sejtek tapadását és morfológiáját figyeltük PVA hidrogél jelenlétében. A hidrogél elkészítéséhez PVA-oldatot, GDA-t és desztillált vizet használtunk, a gélképződést 2 M-os sósavoldattal indukáltuk. A hidrogéleket Petri-csészébe helyeztük, és a sejteket a felületekre oltottuk. 192 órás inkubálást követően inverz mikroszkóppal vizsgáltuk a mintákat, a változásokat fotókkal dokumentáltuk (Olympus CK2).

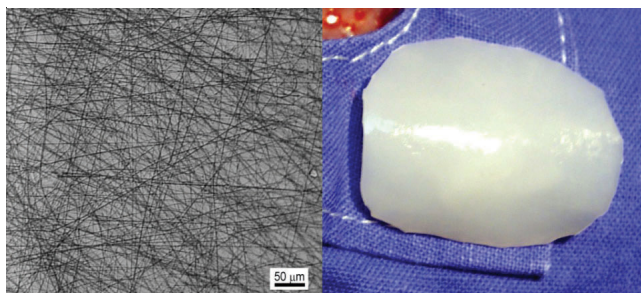
Végül a PVA-hálókat, amelyeket a médiumban (DMEM 6546, Sigma Aldrich) 24, 48, 72, 96 és 168 órán át inkubáltunk; 10% fetal calf serum (Kvalitex), 4% L-glutamin (Life Technologies) és gentamicin (Sandoz) (37 °C, 5% CO₂) hozzáadása után 24 lyukú plate-eken tanulmányoztuk (Sarstedt). A hálókat 2 M sósavoldattal előkezeltük és ClO₂-vel sterilizáltuk. A kísérletek azt is igazolták, hogy a ClO₂ nincs negatív hatással a sejtek életképességére és osztódására, antibiotikus hatása pedig jól ismert [12]. A kontrollcsoportban A-549 sejteket helyeztünk el médiumban, hálók nélkül. A sejteket tripán-kék festékkel vizualizáltuk, a fotók digitális fényképezőgéppel (DEM 130, Scope Photo szoftver) készültek.

In vivo vizsgálatok

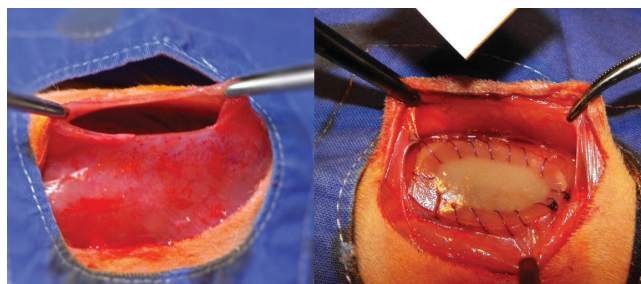
A PVA vizsgálatára negyvenkét felnőtt, hím, albínó Wistar patkányt használtunk fel, amelyek tömege 200–250 g volt. Az állatokat itatóüveggel ellátott patkánykennelben tartottuk, maximum négy állattal kennelenként, standard laboratóriumi körülmények között, és patkányoknak gyártott pellet formátumú tápot kaptak. Az állatokat 20–22 °C-os hőmérsékleten tartottuk, 50–60%-os relatív páratartalommal és 12 órás világos-sötét ciklusokkal. A patkányokat véletlenszerűen választottuk ki és 10 csoportra osztottuk őket. Az összes kísérlet a saját kutatócsoportunk által kidolgozott protokoll szerint zajlott. Anaestheziára ketamin/xylazin 4:1 térfogatarányú keverékét alkalmaztunk. Az állatkísérletet a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) engedélyezte.



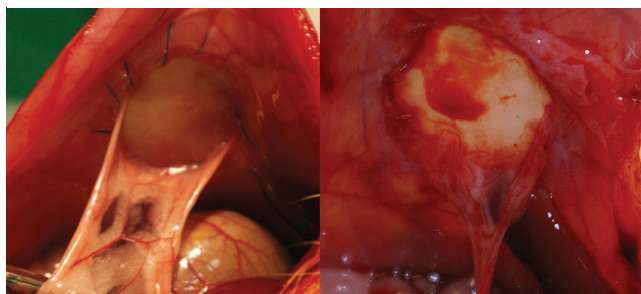
1. ábra | A nanoszálkészítés sémás folyamata



2. ábra | A nanoszálakból álló szövet szerkezete (bal oldal) és makroszkópos képe (jobb oldal)

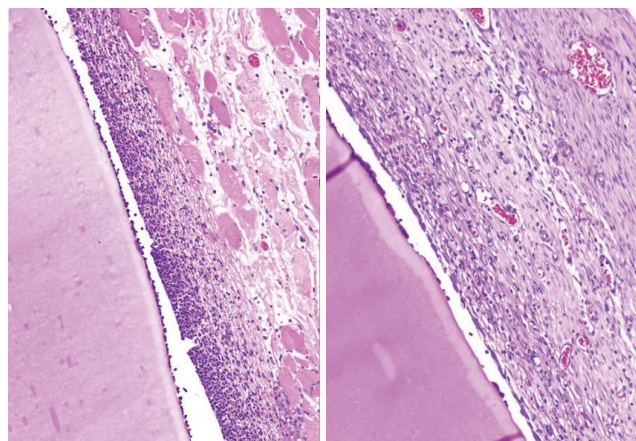


3. ábra | Hasfali szövethiány lefedése PVA-hálóval



4. ábra | A műtési terület képe a késői posztoperatív időszakban

A kontrollállatokon ($n = 15$) egy 4 cm-es medián laparotomiát végeztünk, majd kétrétegű zárást alkalmaztunk 3/0-s varróanyaggal. Reoperációra az 1. ($n = 3$), 2.



5. ábra | A beültetett háló környékének szövettani képe

($n = 3$), 3. ($n = 3$), 4. ($n = 3$), 5. ($n = 3$), 7. ($n = 3$) és 14. ($n = 3$) posztoperatív napokon került sor. A keletkezett adhéziókat makroszkóposan értékeltük.

A sérvmodellben a bőr paramedián bemetszését követően a hasfal jobb oldalán egy szövethiányt hoztunk létre ($\phi d = 2$ cm). A hiányt PVA-hálóval fedtük le ($\phi d = 2,5$ cm), a hálót pedig egyszerű tova futó varrattal rögzítettük, adhezív, nem felszívódó polipropilén varróanyaggal (4/0) (3. ábra). A bőrt egyszerű csomós varrattal zártuk be (3/0-s varróanyag).

Az állatokat az 1., 2., 3., 4., 5. és 7. posztoperatív napon termináltuk és vizsgáltuk a rövid távú, illetve a 14., 30. és 90. posztoperatív napon a hosszú távú értékelés céljából. Mindegyik csoportban 3 állat volt. A paramedián feltárás után leírtuk az adhéziók helyét és tulajdonságait [13]. Az adhéziókat leválaszthatóság, alak és méret szerint értékeltük (a Diamond-klasszifikációhoz [14] nagyon hasonló, saját rendszer szerint).

Az alak megállapítása az összetapadt felszín kétdimenziós mérésével történik, az alábbi kategóriák szerint: szálagos (az összetapadt felszín kisebb, mint $0,5 \times 0,5$ cm), függőyszerű (az összetapadt felszínnek hossza $>0,5$ cm, de szélessége $<0,5$ cm) és nagy kiterjedésű (az összetapadt felszínnek nagyobbak, mint $0,5 \times 0,5$ cm).

Az adhézió leválaszthatóságának értékeléséhez az adhéziókat erősségük szerint három csoportba osztottuk: instabil, közepesen stabil, stabil. Instabil adhéziók esetén a felszín a reoperáció és a mintavétel során könnyen, esetleg maguktól elválhatnak egymástól. A közepesen stabil adhéziók a reoperáció és a mintavétel során összetapadva maradnak, de közepes húzással nagyobb szövettroncsolás vagy vérzés nélkül elválaszthatóak. A stabil adhéziókat még erős húzással sem lehet elválasztani egymástól, csak éles preparálással és súlyos vérzés veszélye mellett. A lokális reakciót makroszkóposan és szövettanilag is értékeltük. A célunk az volt, hogy a biokompatibilitást a korai és a késői adhéziós, gyulladásos és kötőszöveti válaszreakciók mérésével értékeljük.

A szövettani mintákat 10%-os formaldehidoldattal fixáltuk, paraffinba ágyaszták, és kézzel metszették (vastagság 4 μm). A metszeteket hematoxilin-eozin (HE) festéssel festették, kézzel, csoportokban, majd Panoramic Scan (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) rendszerrel digitalizálták, Plan-Apochromat 20-szoros nagyítású objektívvel, 1,6 \times kameraadapter-nagyítással és 1 \times Optovar nagyítással, CIS VCC-FC60FR19CL kamerával. Ez az összeállítás 0,24 μm /pixel felbontást eredményezett. Az így digitalizált teljes metszeteket Panoramic Viewer (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) szoftverrel vizsgálták. A hálóval szemben kialakult gyulladásos reakciót a típusa és intenzitása alapján értékeltük.

Eredmények

24 óra elteltével a sejtek normális morfológiával rendelkeztek a PVA-oldatban, a hidrogél felszínén nem találtunk sejteket. 72 órát követően a sejtek a Petri-csészében levő oldatban konfluensek voltak, és a hidrogél jelenlétében is a sejtvonalra jellemző alak volt látható.

A hálókat 24 lyukú plate-eken vizsgáltuk. Itt a tapasztalatok azt mutatták, hogy a sejtek nem tapadnak a háló felszínére, de a plate-ek alján csoportokban felfedezhetők voltak.

Három sérvmodellpatkányt idő előtt terminálni kellett a háló elmozdulása miatt. A vizsgálat ideje alatt fertőzést nem találtunk. Öt állatban kevés serosus folyadékot fedeztünk fel a háló és a bőr között az 1. ($n = 1$), 2. ($n = 2$) és a 3. ($n = 2$) posztoperatív napon.

A bőr eltávolítása után láthatóvá vált, hogy a háló jól integrálódott a környező szövetekbe. A sérvmodellcsoportban 4 szálagos, 17 függönyszerű és 6 nagy kiterjedésű adhéziót találtunk, többségük ($n = 19$) a varrathoz tapadt és csak kevés ($n = 5$) a hálóhoz, utóbbiak minden esetben kevesebb mint a felszín egyharmadát borították be. Az adhéziókat alkotó fő szerv a nagycseplesz volt, de közelsége miatt néhány ($n = 6$) alkalommal a máj is részt vett a kialakításukban.

Az adhéziók tartósságát a mintavétel közben enyhe vagy erős húzással értékeltük. Az adhézió 6 esetben volt instabil, főleg a korai posztoperatív (1–3.) napokban. Erősebb húzás kellett a közepesen stabil adhéziók ($n = 13$) szétválasztásához, ami a 3–5. posztoperatív napon dominált. Nyolc esetben találtunk stabil adhéziót, ahol még erős húzásra sem váltak el egymástól az összetapadt felszínek, ez főleg a késői posztoperatív szakban volt jellemző (4. ábra).

A kontrollcsoportban nem volt jellemző az adhézió. Mindössze két állatnál találtunk függönyszerű adhéziót, mindkét esetben a cseplesz tapadt keskeny vonalban a metszéshez.

A PVA-háló és a peritoneum közötti interakciót a mintákon patológus vizsgálta. A beültetett háló környékén az első néhány napban várható mértékű akut gyulladásos reakció volt jelen, ami nem különbözött számottevően a kontrollállatokon a metszés környezetében tapasztalt

gyulladástól (5. ábra, bal oldal). A hosszabb távú megfigyelések során azt láttuk, hogy a háló környezetében a gyulladás lecsillapodott, és akadálytalanul megindult a hegképződés (5. ábra, jobb oldal). A vizsgálat során a hálóval összefüggésbe hozható óriássejtes granulomát nem találtunk, a háló szerkezetét épnek találtuk. Így megállapítható, hogy a polimer háló szövetbarát, biokompatibilis, a környező szöveteket nem károsítja, azokkal jól integrálódik.

Megbeszélés

A tanulmány célja a polivinil-alkohol (PVA) sérvháló orvosi biológiai viselkedésének értékelése volt. Ebben az áttekintésben egy új, electrospinninggel készült 3D hálót vizsgáltunk mind *in vitro*, mind *in vivo* tesztekkel. Az *in vitro* eredmények szerint a sejtek a PVA oldatában és a PVA hidrogél jelenlétében is képesek voltak a szaporodásra. A PVA-háló és bomlástermékei semmilyen toxikus hatással nem voltak az A-549 sejtekre, ezek normális morfológiát mutattak a jelenlétében, viszont a háló felszínére nem tapadtak ki, ami azt jelzi, hogy a PVA nem adhézív.

Állatkísérleteinkben a PVA-hálót hasfali sérv rekonstrukciójára használtuk, megvizsgáltuk a hatékonyságát, adhéziógeneráló hatását és a gyulladásos választ. Hosszú távú kísérletünkben szignifikánsan több kitapadást találtunk a varratokhoz, mint a háló felületéhez.

A szövettani megfigyelések szerint a hálók a szerkezetük megtartása mellett beépültek a környező szövetekbe. Idegentest-granulomát nem találtunk, ami alátámasztja az *in vitro* kísérletekben tapasztalt biokompatibilitást.

Következtetés

Kijelenthető, hogy a PVA-háló biokompatibilis és alkalmas a további vizsgálatra. A mesterséges szövetpótlás a jövőben alternatívát nyújthat a szövet hiányának vagy funkcióvesztésének jelenlegi terápiás megoldásaira.

Anyagi támogatás: Ezt a kutatást az OTKA K 105523. finanszírozta.

A szerző a cikk végleges változatát elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőnek nincsenek érdekltségei.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Weber György intézetvezető úrnak, hogy lehetővé tette a kutatást, és személyesen is támogatott a munkában. Köszönöm továbbá Dr. Szabó Györgyinek, Fehér Daniellának, Dr. Csukás Domokosnak, Dr. Juhos Krisztinának, Vódliné Schum Ibolyának és Szentés Péternek a segítséget. Külön köszönet Molnár Kristófnak, aki a hálókat a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetének Nanokémiai Kutatócsoportjában készítette.

Irodalom

- [1] Bageacu, S., Blanc, P., Breton, C. *et al.*: Laparoscopic repair of incisional hernia: a retrospective study of 159 patients. *Surg. Endosc.*, 2002, 16(2), 345–348.
- [2] Mariette, C., Wind, P., Micelli Lupinacci, R., *et al.*: Practice patterns in complex ventral hernia repair and place of biological grafts: a national survey among French digestive academic surgeons. *J. Visc. Surg.*, 2014, 151(1), 9–16.
- [3] Novitsky, Y. W., Harrell, A. G., Hope, W. W., *et al.*: Meshes in hernia repair. *Surg. Technol. Int.*, 2007, 16, 123–127.
- [4] Halm, J. A., de Wall, L. L., Steyerberg, E. W., *et al.*: Intraperitoneal polypropylene mesh hernia repair complicates subsequent abdominal surgery. *World J. Surg.*, 2007, 31(2), 423–430.
- [5] Cheong, Y. C., Laird, S. M., Li, T. C., *et al.*: Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Hum. Reprod. Update*, 2001, 7(6), 556–566.
- [6] Kössi, J., Salminen, P., Rantala, A., *et al.*: Population-based study of the surgical workload and economic impact of bowel obstruction caused by postoperative adhesions. *Br. J. Surg.*, 2003, 90(11), 1441–1444.
- [7] Bellón, J. M., Rodríguez, M., García-Hondurilla, N., *et al.*: Partially absorbable meshes for hernia repair offer advantages over nonabsorbable meshes. *Am. J. Surg.*, 2007, 194(1), 68–74.
- [8] Agresta, F., Baldazzi, G. A., Ciardo, L. F., *et al.*: Lightweight partially absorbable monofilament mesh (polypropylene/polyglactone 25) for TAPP inguinal hernia repair: initial experience. *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan Tech.*, 2007, 17(2), 91–94.
- [9] Tsukruk, V. V., Reneker, D. H.: Periodic surface instabilities in stressed polymer solids. *Phys. Rev. B Condens. Matter*, 1995, 51(9), 6089–6092.
- [10] Kenawy, E. R., El-Newehy, M. H., Abdel-Hay, F. I., *et al.*: Synthesis and biocidal activity of modified poly(vinyl alcohol). *Arabian J. Chem.*, 2014, 7(3), 355–361.
- [11] Ziabari, M., Mottaghibitalab, V., Haghi, A. K.: Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. *Braz. J. Chem. Eng.*, 2009, 26(1), 53–62.
- [12] Noszticzus, Z., Wittmann, M., Kály-Kullai, K., *et al.*: Chlorine dioxide is a size-selective antimicrobial agent. *PLoS ONE*, 2013, 8(11), e79157.
- [13] Zuhlke, H. V., Lorenz, E. M., Straub, E. M., *et al.*: Pathophysiology and classification of adhesions. *Langenbecks Arch. Chir. Suppl. II. Verh. Dtsch. Ges. Chir.*, 1990, 1009–1016.
- [14] Diamond, M. P., Freeman, M. L.: Clinical implications of postsurgical adhesions. *Hum. Reprod. Update*, 2001, 7(6), 567–576.

(Guba Péter Marcell,
Budapest, Nagyváradi tér 4., 1089
e-mail: gmarci90@gmail.com)